



関西学院大学リポジトリ

Kwansei Gakuin University Repository

# 分岐鎖ポリアミンが超好熱菌の転写に及ぼす影響

著者	家森 優佳
発行年	2018
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10236/00028009">http://hdl.handle.net/10236/00028009</a>

## 分岐鎖ポリアミンが超好熱菌の転写に及ぼす影響

関西学院大学大学院理工学研究科

生命科学専攻 藤原研究室 家森 優佳

【研究目的】 ポリアミンとは分子内に複数のアミノ基を持つ脂肪族炭化水素の総称である。ポリアミンはあらゆる生物に存在し、細胞増殖や分化に関与することが知られている。さらにポリアミンは T7 RNA ポリメラーゼといった酵素の活性化に寄与する事も知られている<sup>1)</sup>。超好熱性アーキア *Thermococcus kodakarensis* (生育至適温度 85°C、生育温度範囲 60-100°C) はスペルミジン (SPD) (34) など一般的な直鎖状ポリアミンに加えて、分岐した構造をもつポリアミン (BCPA) である *N*<sup>4</sup>-ビス(アミノプロピル)スペルミジン (3(3)(3)4) を有する。BCPA 合成酵素 (BpsA) の遺伝子を破壊した *T. kodakarensis* は 93°C 以上で生育できなくなることから、BCPA が超好熱菌の高温での生育に必要不可欠であることが示された<sup>2)</sup>。しかし、BCPA が担う詳細な機能は不明である。そこで本研究では、BCPA が超好熱菌の転写に及ぼす影響の解明を目的とし、① BCPA が RNA ポリメラーゼ (RNAP) に及ぼす影響、② BCPA 特異的に転写制御を受ける遺伝子の同定および作用機序の解明に取り組んだ。

【実験方法】 BpsA 遺伝子破壊株および非破壊株から RNAP を精製し、SDS-PAGE 及び LC-MS によって、細胞内の BCPA の有無が RNAP 複合体の構造に与える影響を解析した。また、*T. kodakarensis* の RNAP を用いた *in vitro* 転写実験系を用い、各 RNAP の転写活性を比較した。この転写実験では 70、80 または 90°C で 25 分間転写反応を行った後、DNaseI 処理を行って基質 DNA を除去した。得られた転写産物を尿素変性ポリアクリルアミドゲルに供し電気泳動を行い、EtBr を用いて染色・検出を行った。さらに、破壊株から取得した RNAP を用いた *in vitro* 転写実験系に SPD または BCPA を添加し、ポリアミンの効果を検証するとともに、ポリアミン添加または非添加の条件で RNAP を 90°C で熱処理し、残存活性 (ポリアミンによる安定化) を測定した。また、BpsA 破壊株および野生株を用いたトランスクリプトーム解析を行った。BCPA によって転写制御を受ける遺伝子を同定し、そのうちの *tk0134* に着目して qRT-PCR および *in vitro* 転写実験によって BCPA による転写制御機構の解明を試みた。

【実験結果と考察】 各株から取得した RNAP の複合体構造を LC-MS 解析によって比較した結果、RNAP コア複合体以外のタンパク質成分に違いが見られた。この結果 BCPA がこのタンパク質群との相互作用に影響を与えることが示唆された。また、各 RNAP の 70、80、90°C における転写活性の比較では、80°C、90°C において BpsA 遺伝子破壊株の転写活性は非破壊株と比べ著しく低下した。しかし、BCPA を転写反応系に添加することで、破壊株から取得した RNAP の転写活性が、非破壊株由来 RNAP と同等まで回復した。また熱処理後の残存活性もポリアミン添加により高く維持されることが明らかになった。この RNAP に対する効果は BCPA の方が SPD よりも高かった。以上より、BCPA が高温環境下にある超好熱菌において RNAP の安定化に寄与し、高温で効率的な転写反応を行う上で重要な役割を担うことが示された。さらにトランスクリプトーム解析によって、BCPA によって特異的に転写制御を受けると考えられる遺伝子 (*tk0134*) を同定した。定量 RT-PCR の結果と *tk0134* 周辺の塩基配列の特徴から、BCPA が *tk0133-tk0134* 間の連続的な転写に関与することが予想された。しかし *in vitro* 実験系を用いて転写終結の検証を行ったが、*tk0133* での転写終結は起こらなかった。このことから、BCPA による転写制御は BCPA と DNA の相互作用だけでは起こらないと考えられるとともに、転写終結以外の可能性についても探る必要があると考えられた。

### 【参考文献】

(1) Iwata *et al.*, Bioorg Med Chem. 8(8):2185-2194 (2000), (2) Okada *et al.*, J. Bacteriol. 196, 1866-76 (2014)